

همسانه‌سازی و بیان ژن ناحیه یک فاکتور کشنده‌ی (Lethal Factor) باسیلوس آنتراسیس در باکتری *Escherichia coli*

مهدی رضائی، حسین هنری*، علی محمد زند

گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۳۰ اصلاح نهایی: ۹۱/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۴

چکیده:

زمینه و هدف: سیاه‌زخم (آنتراکس) یک بیماری مشترک بین انسان و دام است. عامل ایجاد کننده بیماری باکتری باسیلوس آنتراسیس می‌باشد که آنتی‌ژن حفاظت‌کننده (PA) و ناحیه یک فاکتور کشنده (LFD1) ایمونوژن‌های قوی این باکتری بوده و همواره به عنوان کاندیدای واکسن علیه باسیلوس آنتراسیس در نظر گرفته شده‌اند. هدف این مطالعه تولید آنتی‌ژن ناحیه یک فاکتور کشنده (LFD1) در باکتری *Escherichia coli* می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی ژن LFD1 از پلاسمید pXO1 شناسایی و با واکنش PCR تکثیر شد. با جایگاه‌های آنزیمی Xho I و BamH I در وکتور (pGEM-T easy) همسانه‌سازی شد و بعد از جداسازی به وکتور بیانی pET28a(+) زیرهمسانه‌سازی گردید. این وکتور به باکتری *E. coli*-BL21 (DE3) تراریخت (ترانسفورم) شد. بیان ژن LFD1 تحت القای ایزوپروپیل -β-D-I- گالاکتوپیرانوزید (IPTG) انجام و پروتئین مورد نظر بیان شد.

یافته‌ها: ژن ناحیه یک فاکتور کشنده (LFD1) کلون شده در وکتور بیانی pET28a(+) به وسیله‌ی توالی یابی، PCR و هضم به وسیله آنزیم‌های با اثر محدود تأیید گردید. همچنین پروتئین نوترکیب تولید شده به وسیله سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل (SDS-PAGE) و لکه‌گذاری وسترن تأیید گردید. نتیجه‌گیری: با توجه به ایمونوژن بودن پروتئین LFD1، پروتئین نوترکیب تولید شده در این تحقیق را می‌توان به صورت مجزا یا ترکیبی با یاورها و یا انتقال دهنده‌ها در طراحی واکسن برای بیماری سیاه‌زخم استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس آنتراسیس، پروتئین نوترکیب، سیاه‌زخم، ناحیه یک فاکتور کشنده.

مقدمه:

نمی‌شود (۱). باسیلوس آنتراسیس علاوه بر یک DNA حلقوی به اندازه ۴/۵ مگاباز، دارای دو پلاسمید بزرگ pXO1 (شامل ژن‌های توکسیک) و pXO2 (شامل ژن‌های مولد کپسول) می‌باشد. کپسول عامل تعیین‌کننده در بیماری‌زایی بوده و باکتری را در برابر هجوم ماکروفاژهای میزبان محافظت می‌کند. توکسین با واسطه یک پلاسمید به نام PBA1 یا pXO1 ایجاد می‌شود، که ۳ پروتئین یا فاکتور مولد ادم (Edema Factor=EF)، آنتی‌ژن محافظت‌کننده (Protective Antigen=PA) و فاکتور مولد مرگ

سیاه‌زخم یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام بوده و دارای پتانسیل استفاده در جنگ‌های بیولوژیک می‌باشد. بیماری سیاه‌زخم در انسان در نتیجه تماس مستقیم با حیوانات بیمار و یا فرآورده‌های حیوانات مانند پوست، مو و پشم ایجاد می‌شود. بنابراین دامپزشکان، دامداران، میکروب‌شناسان، کشاورزان، چوپانان، کارگران کشتارگاه‌ها و کارگرانی که در صنایع پوست و پشم کار می‌کنند بیشتر در معرض ابتلاء به این بیماری هستند. در حیوانات میکروب سیاه‌زخم به طور مستقیم از حیوان آلوده به حیوان سالم منتقل

*نویسنده مسئول: تهران-توربان بابایی-دانشگاه جامع امام حسین-گروه علوم زیستی-تلفن: ۰۲۱-۷۷۱۰۷۹۳۵

E-mail: honari.hosein@gmail.com

سلولی (Lethal Factor=LF) را کد می‌کند (۳،۲).

PA برای سمیت سلول میزبان در ترکیب با LF یا EF ضروری است که به ترتیب توکسین کشنده یا توکسین تورمزا تولید کرده (۴) و دارای ناحیه اتصال به رسپتور سلول میزبان بوده و ورود کمپلکس‌های توکسین را به درون سلول میزبان تسهیل می‌نماید (۵). این کمپلکس‌ها از طریق آندوسیتوز وارد سیتوزول شده و با اسیدی کردن آندوزوم، دو عامل LF و EF از طریق کانال‌های پروتئینی ای (β -barrel چهارده رشته‌ای) که PA برای آن‌ها فراهم آورده است به درون سیتوپلاسم سلول میزبان نفوذ کرده در آنجا با کمک کلسیم، کالמודولین و روی (در مورد LF) فعالیت‌های کاتالیتیکی خود را بروز می‌دهند. LF با ایجاد برش در سمت انتهای آمینی سوبسترای اختصاصی خود یعنی Mitogen-activated Protein Kinase Kinases (MAPKKs) باعث شکستن آن می‌شود. با این عمل سیگنال‌های لازم جهت تکثیر متوقف شده و سلول به سوی مرگ پیش می‌رود (۸،۷،۶).

پروتئین LF دارای چهار ناحیه اصلی می‌باشد که ناحیه ۱ از اسید آمینه‌ی ۱ تا ۲۶۲ امتداد می‌یابد و محل اتصال به پروتئین مصونیت‌زا می‌باشد. ناحیه ۲ از دو بخش مجزا تشکیل شده است که پس از فولدینگ در کنار هم قرار می‌گیرند و شامل اسید آمینه‌های ۲۶۳ تا ۳۰۲ و ۳۸۳ تا ۵۵۱ می‌باشد. ناحیه ۳ از اسید آمینه‌ی ۳۰۳ تا ۳۸۲ تشکیل شده و ناحیه ۲ و ۳ در تشکیل جایگاه فعال آنزیمی نقش دارند. ناحیه ۴ که از اسید آمینه ۵۵۲ تا ۷۷۰ امتداد دارد، بخش کاتالیتیک پروتئین بوده و محل برهمکنش با Zn^{2+} می‌باشد (۹).

سیاه‌زخم در سه فرم پوستی، گوارشی و استنشاقی اتفاق می‌افتد (۱۰). اگر بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود، عفونت با آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شود، اما علائم همیشه به موقع ظاهر نمی‌شوند تا درمان آنتی‌بیوتیکی موثر باشد. بنابراین واکسیناسیون برای حمایت اشخاصی که در معرض خطر هستند الزامی

است. از این رو تعدادی از آنتی‌ژن‌های باسیلوس *آنتراسیس* به منظور بررسی توانایی‌شان برای القای ایمنی حمایتی بر علیه بیماری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از شناخته‌ترین این آنتی‌ژن‌ها می‌توان کپسول، لایه S، پلی‌ساکاریدهای سطحی و پروتئین‌های دیگر را نام برد. تنها پروتئین‌هایی که با یکدیگر توکسین سیاه‌زخم را می‌سازند، باعث تولید آنتی‌بادی‌های قابل شناسایی می‌شوند (۱۱،۱۲،۱۳). بیشتر واکسن‌های موجود بر پایه کار بر روی PA می‌باشند. در حال حاضر واکسن سیاه-زخم مجوز گرفته در انگلستان از کشت سویه Sterne باسیلوس *آنتراسیس* فیلتر شده در رسوب alum رشد یافته است و در نتیجه دارای حداکثر پروتئین PA تولیدی می‌باشد. واکسنی که در ایالات متحده آمریکا اجازه استفاده گرفت Anthrax Vaccine Adsorbed (AVA) است. اما برنامه طولانی واکسیناسیون (۶ واکسیناسیون طی ۱۸ ماه) این واکسن‌ها را محدود می‌سازد (۱۴).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که برای دستیابی به واکسنی کارآمد باید از LF استفاده شود، چون تیتراژ آنتی‌بادی تولیدی توسط این آنتی‌ژن بالا می‌باشد (۱۵). از طرفی طی آزمایشی مشخص شد که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده علیه LF بعد از برهمکنش با LF بیشترین برهمکنش را با LFD1 دارد که نشان دهنده اهمیت این ناحیه می‌باشد (۱۶). همچنین طی تحقیقی مشخص شد که تعداد اپی‌توپ‌های LFD1 تقریباً دو برابر هر کدام از ناحیه‌های دیگر است و بیشترین تاثیر را در تولید آنتی‌بادی را LFD1 دارد (۱۷). از آنجایی که LF یک متالوپروتئین بوده و موجب مرگ سلولی می‌شود کار بر روی کل آن ممکن است خطرناک باشد. همچنین دست‌ورزی ژنتیکی LFD1 که توالی کوتاه‌تری از کل توالی LF دارد راحت‌تر می‌باشد (۱۸). لذا در این تحقیق به منظور تولید واکسن‌های نو ترکیب مناسب، ناحیه ۱ فاکتور کشنده باسیلوس *آنتراسیس* انتخاب و همسانه‌سازی و بیان گردید.

روش بررسی:

طراحی پرایمر برای ژن *LFD1* مربوط به باکتری *باسیلوس آنتراسیس*:

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، توالی کامل ژن *lef* باکتری *باسیلوس آنتراسیس* از Gene bank (NCBI با شماره M29081) استخراج و به کمک نرم افزارهای primer3 و Oligo و DNASIS پرایمرها طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد. پرایمر بالادست دارای جایگاه شناسایی آنزیم *BamH I* و پرایمر پایین دست دارای جایگاه شناسایی آنزیم *Xho I* است که به وسیله نرم افزار تحت شبکه BIOLABS_NEB-cutter تعیین شدند.

توالی پرایمر رفت با جایگاه شناسایی آنزیم *BamH I* با اثر محدود

5'-TAGGATCCGGCGGTCATGGTGATGTAG-3'
توالی پرایمر برگشت با جایگاه شناسایی آنزیم *Xho I* با اثر محدود

5'-CGCTCGAGATTATCTAGATAGATTTATTTCTGTTCGTTAAAT-3'

تکثیر ژن *LFD1* با واکنش *PCR*. باکتری *باسیلوس آنتراسیس* سویه V770-NP1-R که فاقد پلاسمید *pXO2* بوده ولی پلاسمید *pXO1* را دارد و به صورت غیر فعال شده در فرمالین از بخش هوازی موسسه رازی تهیه شد. پلاسمید باکتری با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از اسپکتروفتومتری تعیین غلظت گردید و به عنوان الگو در واکنش *PCR* استفاده شد. واکنش *PCR* برای تکثیر ژن *LFD1* ابتدا با ۰/۱۲۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلی مرز (سیناژن)، غلظت ۲ میلی مولار *MgCl2*، ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی مولار *dNTPs* و در دمای اتصال ۶۱ درجه سانتی گراد بهینه سازی شد. به منظور جلوگیری از جهش های ناخواسته تکثیر نهایی ژن با استفاده از آنزیم *Pfu* پلی مرز (Fermentas) در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. هر واکنش *PCR*

شامل ۰/۴ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۴ میلی مولار *dNTPs*، ۰/۲۵ واحد آنزیم *DNA* پلی مرز *Pfu*، ۲/۵ میکرولیتر بافر *10XPCR* و *MgSO4* با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار و ۵۰ نانوگرم از پلاسمیدهای استخراج شده *باسیلوس آنتراسیس* بود. چرخه های *PCR* شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۰ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود (۱۹).

همسانه سازی قطعه حاصل از واکنش *PCR*: محصول *PCR* به کمک مارکر اسید نوکلئیک (#SM0313) روی ژل آگارز بررسی شد. سپس روی ژل آگارز با دمای ذوب پایین با غلظت ۱ درصد (سیناژن) منتقل شد. با استفاده از کیت استخراج *DNA* از ژل آگارز (*Bioneer*)، محصول *PCR* از ژل آگارز با دمای ذوب پایین استخراج گردید و نوکلئوتید *A* به انتهای ۳' آن اضافه شد. واکنش الحاق محصول *PCR* دارای دنباله *A* و وکتور *pEGM-T Easy Vector* (Promega) که دارای دنباله *T* در انتهای ۳' خود است، با کمک آنزیم *T4* لیگاز به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. بعد از انجام همسانه سازی، تراریختی و کتور نو ترکیب حاصل با روش شوک حرارتی به سلول های مستعد *E.coli* سویه *DH5α* انجام گرفت و سپس این باکتری ها بر روی پلیت *LB* آگار دارای *Xgal-IPTG* و آمپی سیلین با غلظت ۸۰ μg/ml کشت داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان ۱۲ ساعت کلنی های سفید و آبی رنگ قابل مشاهده اند. از ویژگی های این وکتور این است که جایگاه چندگانه همسانه سازی در وسط ژن β-گالاکتوزیداز قرار گرفته است. ورود قطعه همسانه سازی شده در این وکتور با غیر

فعال شدن ژن β -گالاکتوزیداز همراه است. بنابراین غربالگری سلولهای حاوی DNA نوترکیب با عدم توانایی آنها در ساخت آنزیم β -گالاکتوزیداز صورت میگیرد. سویههای نوترکیب دارای رنگ سفید و سویههای فاقد وکتور نوترکیب، آبی رنگ میباشند (۱۹).

سپس قطعات توسط آنزیمهای با اثر محدود Sma I و Xho I از Fermentas, #EROO51 BamH I پEGM-T Easy جداسازی و در وکتور بیانی (Qiagen) pET28a(+) که با همین آنزیمها برش خورده بود، زیر همسانه سازی شد. وکتورهای نوترکیب حاصل به سلولهای مستعد *E. coli* BL21(DE3) سویه (Stratagen) تراریخت شدند (۱۹).

بیان ژن مورد نظر: از کشت شبانه کلونهای جداسازی شده میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین با غلظت ۸۰ $\mu\text{g/ml}$ تلقیح و پس از رسیدن OD به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (برای بدست آوردن میزان رشد باکتری)، ماده القاکننده پروموتور ایزوپروپیل- β -D-۱-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) (Fermentas) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به محیط کشت افزوده و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد (۱۲).

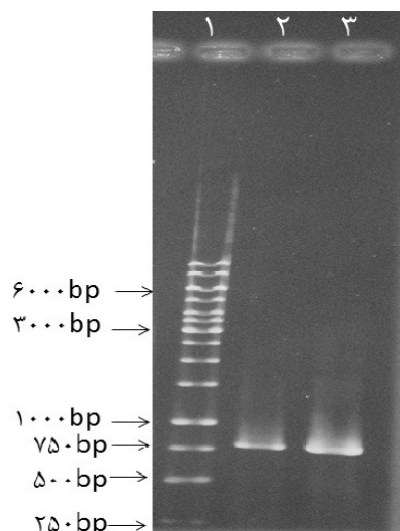
الکتروفورز ملایم دودفیل فسفات پلی آکریل آمیدژل (SDS-PAGE): نمونههای قبل و بعد از القای IPTG، همراه با مارکر پروتئینی (#PR0602-S) (Vivantis) تحت شرایط داناتوره، الکتروفورز شدند. غلظت ژل ۱۲ درصد با جریان ثابت ۲۵ میلی آمپر بود (۱۹).

تایید پروتئین نوترکیب: برای تایید پروتئین نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتیبادی ضد His-tag استفاده شد. عصاره سلولی پس از بیان با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن (Bio-rad Mini Protean) و بافر انتقال (گلایسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار، SDS ۰/۱ درصد و متانول ۲۰ درصد و pH: ۸/۳) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST

(۳۷ NaCl میلی مولار، KCl ۲/۷ میلی مولار، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۴/۳ میلی مولار، توبین ۲۰ درصد و pH: ۷/۲) حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد بلاک گردید. نمونه پس از سه بار شست شو با بافر PBST، به مدت یک ساعت با رقت ۱/۱۰۰۰ آنتیبادی ضد His-tag (ebcam) کانژوگه دار در بافر PBST در دمای اتاق مجاور شد. در نهایت پس از سه بار شست شو با بافر PBST، برای آشکار سازی از سویسترا (بافر تریس ۵۰mM و pH: ۷/۸ حاوی ۶mg DAB، H_2O_2 ۱۰ μl) استفاده شد. پس از انجام واکنش بین کانژوگه و سویسترا و ظاهر شدن باند پروتئینی روی کاغذ نیتروسلولزی، واکنش با استفاده از H_2O متوقف گردید (۱۹).

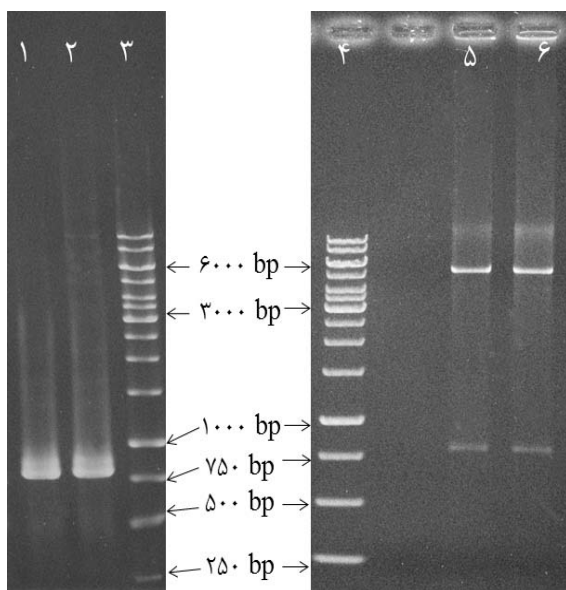
یافته ها:

تکثیر ناحیه ۱ ژن LF: پس از تکثیر ناحیه ۱ ژن LF به روش PCR، محصول روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت که قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما همخوانی داشت (۷۷۱ جفت باز) (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: PCR روی پلاسمید pXO1 و تکثیر ژن ناحیه یک فاکتور کشنده.

چاهک ۱ مارکر اسید نوکلئیک، چاهک ۲ و ۳ محصول PCR (۷۷۱bp).



تصویر شماره ۳: تایید زیرهمسانه سازی ژن هدف در وکتور بیانی pET28a(+).

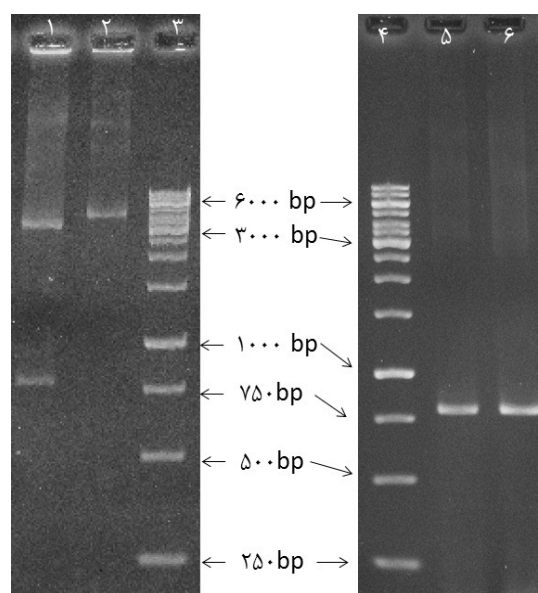
چاهک های ۱ و ۲ محصول PCR روی وکتور pET28a(+), چاهک های ۳ و ۴ مارکر اسید نوکلئیک، چاهک های ۵ و ۶ هضم آنزیمی با اثر محدود روی وکتور pET28a(+) و برش ژن (771bp).

بیان ژن در وکتور pET28a(+) در این مرحله پس از کشت باکتری ها و القا با IPTG بیان ژن صورت پذیرفت. پس از شکست دیواره باکتری ها پروتئین های آنها روی ژل SDS-PAGE برده شد و به کمک مارکر پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن پروتئین نو ترکیب ≈ 32 kD از ژل ۱۲ درصد استفاده شد. نتایج نشان داد که پروتئین مورد نظر در نمونه القا شده بیان شده ولی در نمونه شاهد بیان نشده است (تصویر شماره ۴).

تایید محصول پروتئینی به دست آمده با تکنیک Western Blotting: به منظور تایید محصول پروتئینی از تکنیک Western Blotting استفاده شد. در این روش از آنتی بادی ضد His-tag استفاده شد. در ستون تست که مربوط به نمونه القا شده با IPTG است یک باند در نزدیکی ۳۲ kD مشاهده می شود که در ستون شاهد که تحت القای IPTG نبوده مشاهده نمی شود (تصویر شماره ۵).

تایید همسانه سازی ژن هدف در وکتور pEGM-T Easy: پس از تخلیص پلاسمید و تایید آنها روی ژل آگارز، برای تایید بیشتر از پلاسمیدها به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید، از طرفی با دو آنزیم Xho I و BamH I هضم شدند سپس به کمک مارکر اسید نوکلئیک، اندازه قطعه خارج شده از وکتور (771 جفت باز) تایید شد (تصویر شماره ۲).

تایید زیر همسانه سازی ژن هدف در وکتور بیانی pET28a(+): پس از تخلیص پلاسمید و تایید آنها روی ژل آگارز، برای تایید بیشتر از پلاسمیدها به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده گردید، از طرفی با دو آنزیم Xho I و BamH I هضم گردیدند. سپس به کمک مارکر اسید نوکلئیک، اندازه قطعه خارج شده از وکتور (771 جفت باز) تایید گردید (تصویر شماره ۳).



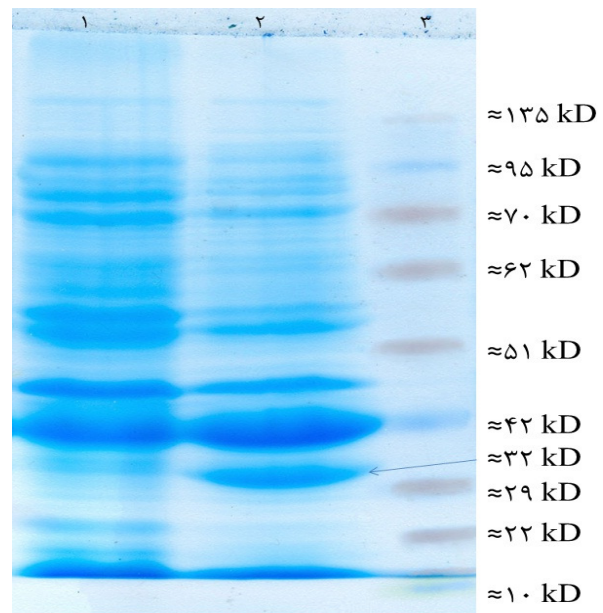
تصویر شماره ۲: تایید همسانه سازی ژن هدف در وکتور pEGM-T Easy.

چاهک ۱: هضم آنزیمی با اثر محدود روی وکتور pEGM-T Easy و برش ژن (771bp)، چاهک ۲ وکتور pEGM-T Easy دارای ژن برش نخورده، چاهک های ۳ و ۴ مارکر اسید نوکلئیک، چاهک های ۵ و ۶ محصول PCR روی وکتور pEGM-T Easy (771bp).

بحث:

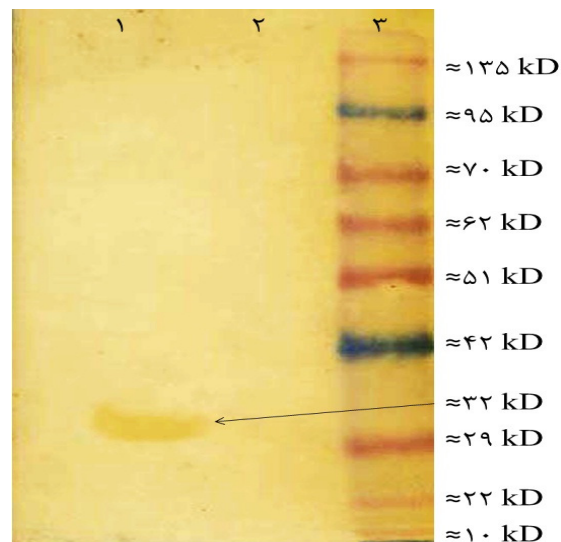
در این مطالعه تجربی ژن LFD1 پس از شناسایی و جداسازی، با استفاده از سیستم TA cloning همسانه سازی و در وکتور بیانی زیر همسانه سازی و در /شرشیاکلی بیان گردید. در سال ۱۹۹۴ مهندسی و ساخت وکتورهای همسانه سازی خانواده T (با تعداد کپی بالا، ژن β -گالاکتوزیداز و MCS اختصاصی) منجر به سهولت همسانه سازی ژن های تکثیر یافته با پلیمرازهایی از قبیل Taq و Taq high fidelity شد. در این مطالعه تجربی نیز با توجه به ارزش چنین سیستمی مبادرت به همسانه سازی در وکتور pGEM-T Easy شد (۲۰). همچنین از وکتور بیانی pET28a(+) استفاده شد. امروزه برای تولید پروتئین های نوترکیب از روش های بیوتکنولوژی استفاده می شود. /شرشیاکلی به عنوان میزبانی برای بیان پروتئین های نوترکیب هم در تحقیقات و هم در صنعت به طور گسترده استفاده می شود. در این تحقیق نیز برای تولید LFD1 نوترکیب از سویه BL21 به عنوان میزبان استفاده شد که فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی از جمله HtpR و Lon، OmpT، DegP می باشد (۲۱). بنابراین بیان مناسب LFD1 در این میزبان به دلیل عدم حضور این پروتئازها می باشد.

در سال ۲۰۰۷ مطالعات Jessica و همکاران نشان داد که پروتئین ممزوجی LFD1-Lichenase تیر آنتی بادی بالایی تولید می کند که این آنتی بادی ها قدرت خنثی سازی سم سیاه زخم در *in vitro* را دارند (۱۵). در سال ۲۰۱۰ آقای Baillie تمامی دومین های LF را به صورت مجزا کلون و بیان نمود و خواص ایمنی زایی آن ها را بررسی نمود که LFD1 توان ایجاد ایمنی زایی را داشت. از آنجایی که بخش عملکردی LF (۷۷۶ اسید آمینه) باسیلوس آنتراسیس که خاصیت کشندگی دارد باعث بروز مرگ سلولی می شود، استفاده از این آنتی ژن در مطالعاتی که در این زمینه انجام می شود امری ضروری می باشد. در این مطالعه



تصویر شماره ۴: بیان ژن ناحیه یک فاکتور کشنده و بررسی آن با الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل (SDS-PAGE)

ستون ۱ نمونه شاهد القا نشده، ستون ۲ نمونه القا شده با IPTG و مشاهده پروتئین ۳۲kD، ستون ۳ مارکر پروتئین.



تصویر شماره ۵: تایید پروتئین حاصل با Western Blotting

ستون ۱ نمونه القا شده با ایزوپروپیل 1-D-B گالاکتوز پیرانوزید و وجود باند در ناحیه ۳۲kD، ستون ۲ نمونه شاهد که تحت القای IPTG نبوده و عدم وجود باند، ستون ۳ مارکر پروتئینی

نتیجه گیری:

ژن LFD1 پس از تکثیر در وکتور pGEM-Teasy همسانه سازی شد، سپس به وکتور pET28a(+) منتقل و همسانه سازی گردید. تمامی شواهد مانند تعیین توالی ژن، تعیین وزن مولکولی پروتئین بیان شده و واکنش با آنتی بادی ضد His-tag مؤید بیان ناحیه ۱ فاکتور کشنده (LFD1) می باشد. لذا در مطالعات بعدی اثرات ایمنی-زایی آن به تنهایی یا به همراه سایر عوامل ایمونوژن قابل بررسی می باشد.

تشکر و قدردانی:

از گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) که حامی این تحقیق بودند کمال تشکر را داریم.

ناحیه LFD1 انتخاب و مورد مطالعه قرار گرفت که مطالعات Albrecht و همکاران (۱۶) و Nguyen و همکاران (۱۷) نشان دهنده وجود بیشترین و مؤثرترین اپی توپ های LF در ناحیه ۱ آن بوده که تایید کننده انتخاب ناحیه مناسب در این مطالعه می باشد.

با توجه به نیاز به تولید واکسن سیاه زخم در کشور و ضرورت استفاده از LF در تهیه واکسن، این تحقیق به منظور تولید پروتئین نو ترکیب LFD1 انجام گرفت و نتایج حاصل از SDS-PAGE و لکه گذاری وسترن مؤید بیان LFD1 در این تحقیق می باشد. لذا از این پروتئین نو ترکیب می توان در مطالعات آتی به منظور تولید واکسن های کارآمد استفاده نمود.

منابع:

1. Brey RN. Molecular basis for improved anthrax vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Jun; 57(9): 1266-92.
2. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. *Gene.* 1989 Sep; 81(1): 45-54.
3. Okinaka R. Sequence assembly and analysis of pXO1 and pXO2. *J Appl Microbiol.* 1999; 87(2): 261-2.
4. Ezzell JW, Ivins BE, Leppla SH. Immuno electrophoretic analysis, toxicity and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of *Bacillus anthracis* toxin. *Infect Immun.* 1984 Sep; 45(3): 761-7.
5. Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Rensatus M, Petosa C, Bienkowska J, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature.* 2001 Nov; 414(6860): 229-33.
6. Elliott JL, Mogridge J, Collier RJ. A quantitative study of the interactions of *Bacillus anthracis* edema factor and lethal factor with activated protective antigen. *Biochemistry.* 2000 Jun; 39(22): 6706-13.
7. Abrami S, Liu P, Cosson H, Leppla S, van der Goot FG. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol.* 2003 Feb; 160(3): 321-8.
8. Guidi-Rontani C, Weber-Levy M, Mock M, Cabiaux V. Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and edema factors across endosome membranes. *Cell Microbiol.* 2000 Jun; 2(3): 259-64.
9. Baillie LW. An anthrax subunit vaccine candidate based on protective region of *Bacillus anthracis* protective antigen and lethal factor. *Vaccine.* 2010 Sep; 28(41): 6740-8.
10. Bartlett J, Inglesby T, Borio L. Management of anthrax. *Clin Infect Dis.* 2002 Oct; 35(7): 851-8.

11. Alan RL. Advances in biotechnological processes. In: Mizrahi A. Bacterial vaccines. New York: Pertussis Vaccines; 1990: 105-22.
12. Singh Y, Ivins B, Leppla S. Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of *B. anthracis*. *Infect Immun*. 1998 Jul; 66(7): 3447-8.
13. Flick-Smith H, Walker N, Gibson P, Bullifent H, Hayward S, Miller J, et al. A recombinant carboxyl- terminal domain of the protective 113 antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection. *Infect Immun*. 2002 Mar; 70(3): 1653-6.
14. Turnbull PC. Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine*. 1991 Aug; 9(8): 533-9.
15. Jessica A, Chichester Konstantin M, de la Rosa P, Horsey A, Stevenson N, Ugulava N, et al. Immunogenicity of a subunit vaccine against *Bacillus anthracis*. *Vaccine*. 2007 Apr; 25(16): 3111-4.
16. Albrecht MT, Li H, Williamson ED, LeButt CS, Flick-Smith HC, Quinn CP, et al. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect Immun*. 2007 Nov; 75(11): 5425-33.
17. Nguyen ML, Crowe SR, Kurella S, Teryzan S, Cao B, Ballard JD, et al. Sequential B-cell epitopes of *Bacillus anthracis* lethal factor bind lethal toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun*. 2009; 77(1): 162-9.
18. Ahsae Z, Salimian J, Nazarian SH, Khalesi R, Olad GhR, Amani J. Cloning, bioinformatics study and evaluation expression of gene of enterotoxigenic *Escherichia coli*. CFA/Imajor subunit (CfaB). *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2011; 13(5): 72-82.
19. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laborator manual. NewYork: CSHL Press. 2001.
20. Association of genomes. [Internet] 2000. [cited 2012] Available from: <http://www.fermentas.com>.
21. Hwang BY, Varadarajan N, Li H, Rodriguez S, Iverson BL, Georgiou G. Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpP. *J Bacteriol*. 2007 Jan; 189(2): 522-30.

Molecular cloning and expression of *Bacillus anthracis* Lethal Factor domain 1 gene in *Escherichia coli*

Rezaee M (MSc), Honari H (PhD)*, Zand AM (MSc)

Biology Sciences Dept., Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 18/Feb/2012 Revised: 5/Jun/2012 Accepted: 9/Jul/2012

Background and aims: Anthrax is a common disease in human and livestock caused by *Bacillus anthracis*. *Bacillus anthracis* has two strong immunogen proteins: Protective antigen (PA) and lethal factor domain I (LFD1) that has been always considered as a candidate vaccine against *Bacillus anthracis*. The aim of this study was to express the lethal factor domain I in *Escherichia coli*.

Methods: In this laboratory experimental study, the gene of LFD1 was detected and amplified from pXO1 plasmid by PCR. The gene was cloned with *Bam* H I and *Xho* I restriction site in cloning vector (pGEM-T easy), after isolation was sub cloned to expression vector pET28a(+). This vector was transformed to *E. coli*-BL21 (DE3) to express LFD1 gene. The expression of LFD1 gene was induced by IPTG, and LFD1 protein was produced.

Results: The cloned LFD1 gene in pET28a(+) vector was confirmed by sequencing, PCR and enzymatic analysis. The expressed recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting.

Conclusion: According to immunogenicity of LFD1 protein, the produced recombinant protein can be used separately or in combination by adjuvants and delivers to design a vaccine against anthrax.

Keywords: Anthrax, *Bacillus anthracis*, Lethal factor domain 1, Recombinant protein.

Cite this article as: Rezaee M, Honari H, Zand AM. Molecular cloning and expression of *Bacillus anthracis* Lethal Factor domain 1 gene in *Escherichia coli*. J Sharekord Univ Med Sci. 2012 Oct, Nov; 14(4): 38-46.

*Corresponding author:

Biology Dept, Imam Hossein University, Babai highway, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00982177107935, E-mail: honari.hosein@gmail.com